

安徽省规模化养殖场鲜奶中氟喹诺酮类药物残留的分析检测

汪雪雁¹, 祁克宗², 檀华蓉³, 魏传宇¹

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036;
3. 安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036)

摘要: 建立了固相萃取-高效毛细管电泳同时分离达氟沙星、恩诺沙星和培氟沙星 3 种氟喹诺酮类药物的方法, 并对来自于安徽 33 个牧场的 165 组牛奶样品进行检测。研究了缓冲液离子浓度、pH、分离电压以及温度等电泳参数, 最终通过正交试验得到最佳分离条件: 紫外检测波长 215 nm, 缓冲液为 40 mmol·L⁻¹ 磷酸氢二钾~20 mmol·L⁻¹ 柠檬酸冲溶液体系, pH8.10, 检测电压 20 kV, 检测温度 25℃。结果表明, 3 种药物在 7 min 内完全分离, 各组分浓度与峰面积呈良好的线性关系, R^2 为 0.997 7~0.999 7; 试验平均回收率在 71.00%~84.58%之间, RSD 为 0.22%~0.67% (迁移时间) 和 5.41%~9.75% (峰面积)。165 组鲜牛奶中 3 种氟喹诺酮类药物的检出率为 9.1%。安徽省奶源存在一定程度的氟喹诺酮类药物残留, 需要加强对牧场的监测和管理力度。

关键词: 牛奶; 氟喹诺酮类药物; 固相萃取; 高效毛细管电泳; 残留

中图分类号: S859.84; R155.57

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)06-0867-04

Determination of fluoroquinolones residues in milk from large-scale farms in Anhui Province

WANG Xue-yan¹, QI Ke-zong², TAN Hua-rong³, WEI Chuan-yu¹

(1. School of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Animal Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

3. Biotechnology Center, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: A method for the simultaneous separation of fluoroquinolones (FQs) by solid phase extraction (SPE) & high performance capillary electrophoresis (HPCE) was developed, and in this way, 165 samples from 33 large-scale farms in Anhui were determined. The effects of several factors such as the ion concentration, pH value of running buffer, the voltage and the temperature on separation of samples were investigated. The optimal condition was found by orthogonal experiment. The optimal conditions were as follows. UV detection wavelength, 215 nm; running buffer, 40 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄-20 mmol·L⁻¹ citric acid; pH 8.10; separation voltage, 20 kV. The results showed that the fluoroquinolones residues can be separated within 7 min, and each had a good linear relationship between concentration and peak area ($R^2=0.997 7-0.999 7$). The average recoveries were between 71.00%—84.58%. The RSDs were 0.22%—0.67% (transition time) and 5.41%—9.75% (peak area). The positive rate was 9.1%, and the method for detection of antibiotic FQs in large-scale farms of Anhui was set up. The monitoring and management on milk-producing households should be enhanced.

Key words: milk; FQs; solid phase extraction; HPCE; residues

牛奶被称为“白色血液”, 是理想的天然食品^[1]。除膳食纤维外, 牛乳含有人体所需要的全部营养物质, 是惟一的全营养食物, 牛乳的人均占有量可以反映出—个国家生活质量和人民身体健康水平^[2]。随着生活水平的提高, 人们对牛奶的需求量不断增加, 同时, 对牛奶质量的要求也越来越高。

氟喹诺酮类(fluoroquinolones, FQs)是新一代合成广谱抗菌药^[3]。在奶牛饲养过程中常用于预防和治疗作用的抗生素药物^[4-5], 这样, 在一定时期内, 牛乳中就会有抗生素残留^[6-7]。我国 2001 年 9 月, 农业部发布实施的《无公害食品生鲜牛奶》行业标准, 对新鲜牛奶的卫生指标明确了“抗生素不得检

收稿日期: 2012-05-15

基金项目: 国家十一五科技支撑项目子项目 (2006BAK02A08-4) 资助。

作者简介: 汪雪雁, 女, 副教授。E-mail: wxy700303@ahau.edu.cn

出”^[8]。但是,鲜牛奶中抗生素残留现象,国内屡有报道^[9-10],当人类经常食用含有抗生素残留物的乳品,会致使病菌的耐药性上升^[11],亦可导致体内正常菌群失去平衡,影响人类健康^[12-14]。因此,检查市售牛奶中抗生素残留已成为一项急需开展的常规检测工作。

本试验以牛奶为试验材料,围绕奶牛养殖业中常用的3种氟喹诺酮类抗生素达氟沙星、恩诺沙星和培氟沙星残留的分析,建立了3种药品的SPE-HPCE法分析方法。以固相萃取小柱对前处理好的牛奶样品进行净化与纯化,用高效毛细管电泳法为检测手段,对牛奶样品进行了检测,并得到了较好的效果,确立了牛奶中的达氟沙星、恩诺沙星和培氟沙星的SPE-HPCE检测方法。对来自于安徽33个牧场的165组牛奶样品进行检测,旨在了解安徽省奶牛场FQs类抗生素的使用情况,检测结果对于监测牛奶中这3种常见的氟喹诺酮类药物的残留,确保人们身体的健康,有着重要的理论和实际意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

2011年4月自安徽省33个规模化奶牛场中采集产奶牛的牛奶样品各5份,编号如下:1-1,1-2,⋯,5-4,5-5,共计165份。

1.2 试验方法

1.2.1 仪器与试剂 高效毛细管电泳仪(P/ACETMMDQ型,美国BECKMAN公司);固相萃取装置(美国SUPELCO公司);分析天平(Sartorius BS 21S,德国赛多利斯公司);组织匀浆机(AM-6E型,日本Nihonseiki Kaisha Ltd);氮吹仪(HGC-24A,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)。

标准品:达氟沙星(纯度99.5%,中国兽药监察所)、恩诺沙星(纯度100.1%,中国兽药监察所)、培氟沙星(纯度99.7%,中国兽药监察所)。

其他试剂均为色谱纯或分析纯,试验用水为二次蒸馏水经超纯水设备去离子,电阻达到18.2MΩ;

1.2.2 样品的提取与净化 本试验采取2种样品前处理方法。方法1:取试样,加乙腈、磷酸,振荡摇匀,10 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,50℃下用旋转蒸发仪浓缩至约1 ml,涡旋摇匀后过C₁₈固相萃取小柱。固相萃取小柱先以甲醇活化,再用甲醇-磷酸和超水平衡,上样,依次用超纯水和甲醇-磷酸淋洗,最后用甲醇-氨洗脱。收集洗脱液,用0.22 μm的脂溶性滤膜过滤,供毛细管电泳测定

分析。方法2:吸取试料样品,加甲酸乙腈溶液,涡旋混合提取,5 000 r·min⁻¹离心5 min,转移上清液至鸡心瓶。再用甲酸乙腈溶液重复提取1次,合并上清液,加正丙醇,于50℃下旋转蒸干。残余物用乙酸铵溶液溶解,备用。HLB小柱依次用甲醇、乙酸铵溶液预洗。取全部备用液过柱,用甲醇水溶液淋洗,减压抽干,用甲醇洗脱,洗脱液于50℃氮气下吹干,残余物以初始比例流动相0.5 mL溶解,过滤膜后供毛细管电泳测定分析。

1.2.3 仪器分析条件 色谱条件。电泳缓冲液为40 mmol·L⁻¹磷酸氢二钾~20 mmol·L⁻¹柠檬酸缓冲液(pH 8.10),采用0.5 psi压力进样5.0 s,分离电压为20 kV,柱温为25℃,紫外检测波长为215 nm,2次进样间用0.1 mol·L⁻¹ NaOH冲洗毛细管柱2 min,超纯水冲洗3 min,缓冲液平衡4 min。

1.2.4 正交试验设计 缓冲液pH的选择。考察了pH为7.5~8.6时,在40 mmol·L⁻¹磷酸氢二钾~20 mmol·L⁻¹柠檬酸缓冲液条件下对3组份分离度的影响。结果表明,当pH 8.0时,相邻两药物之间的分离度均达到1.2以上。因此选择缓冲液pH 7.80、8.10和8.40为正交试验因子。

分离电压的选择。工作电压越大,分离效率越高,但是工作电压越大,使工作电流也越大,焦耳热也越大,焦耳热引起的区带展宽增大,又会引起分离效率的下降。本试验选择17、20和25 kV作为正交试验因子。

分离温度的选择。温度变化不仅影响分离的重现性,而且影响分离的效率。综合考虑各方面因素,选择20、25和30℃时作为正交试验因子。

2 结果与分析

2.1 前处理条件的优化

由于牛奶的组成成分复杂,对分析物干扰性、隐蔽性很大,通常很难被检测,因此,样品中残留抗生素的提取以及净化是本试验中残留检测的关键步骤。

比较方法1与方法2沉淀蛋白的效果以及氟喹诺酮类药物的回收率,结果显示方法1对牛奶蛋白的沉淀效果较理想,回收率明显高于方法2,且毛细管电泳图(见图1)具有杂峰少、药物分离较好的优点,故选择方法1做为前处理方法。

2.2 色谱条件的优化

比较了磷酸氢二钾-柠檬酸溶液、磷酸二氢钾-硼砂溶液、柠檬酸-柠檬酸钠溶液为缓冲液对4组份分离度的影响。结果表明磷酸氢二钾-硼砂缓冲液和

柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液分离效果较差, 3 组份分离效果相对较差; 磷酸氢二钾-柠檬酸缓冲液的分离效果较好。故试验选择磷酸氢二钾-柠檬酸缓冲液作为试验用的缓冲溶液。

将缓冲体系 pH、分离电压、分离温度作为 3 个因素, 每个因素选取 3 个水平, 即 $L_9(3^3)$ 因素 3 水平试验确立最佳的毛细管电泳分离条件, 结果见表 1 所示。

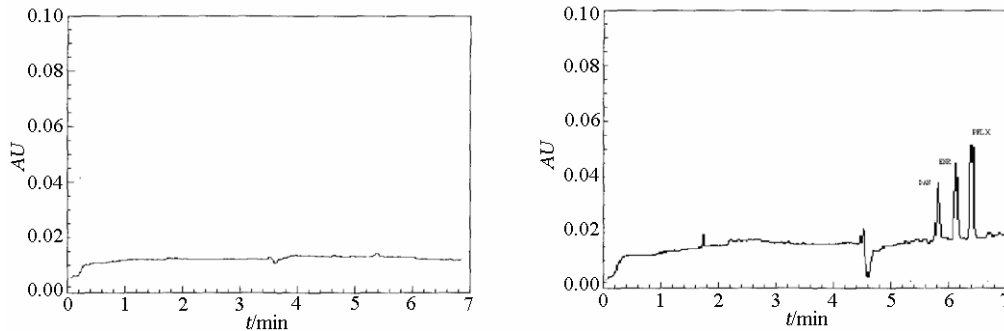


图 1 空白牛奶样品(A)及添加三种氟喹诺酮类药物(B)色谱图

Figure 1 Chromatogram of blank milk sample (A) and milk sample spiked with three fluoroquinolones (B) (a: DAN, b:ENR, c:PFLX)

表 1 正交试验的分离结果

Table 1 Separation results using orthogonal design

	因素Factor			迁移时间/min Transition time	分离度 (R) Separation
	A pH	B 分离电压/kV Voltage	C 温度/°C Temperature		
1	8.40	17	20	9.01	1.03
2	7.80	17	25	6.21	1.08
3	8.10	17	30	7.06	1.09
4	8.10	25	20	8.80	1.13
5	8.40	25	25	7.13	1.18
6	7.80	25	30	7.23	1.23
7	7.80	20	20	8.37	2.11
8	8.10	20	25	6.73	1.49
9	8.40	20	30	7.29	1.30

表 2 3 种药物的回归方程、精密度、检出限和定量限

Table 2 Regression equations, the RSD, limits of determination and limits of quantification of 3 compounds

组分药物 Components	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	RSD%		检出限 LOD	定量限 LOQ
			峰面积 Peak area	保留时间 Migration time		
达氟沙星Danofloxacin	$y = 492.52x - 1970.7$	0.999 2	7.23	0.22	0.45	1.53
恩诺沙星Enrofloxacin	$y = 709.03x - 155.39$	0.999 7	5.41	0.67	0.39	1.25
培氟沙星pefloxacin	$y = 621.49x + 1749$	0.997 7	9.75	0.36	0.30	0.99

由表 1 可知, 第 2 组试验迁移时间最短, 但是分离度较低。综合考虑分离度、迁移时间的因素, 选择第 8 组即 pH8.10, 20 kV, 25°C 作为最佳电泳分离条件。

2.3 分析方法的评价

2.3.1 线性关系、精密度和最低检测限 将浓度为 1.95、15.625、31.25、50、62.5 和 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准工作液, 在优化的色谱条件下测定, 以浓度

(x) 为横坐标, 以相应峰面积(y)为纵坐标做回归分析, 得到 3 种 FQs 的标准曲线和相关系数(表 2)。由表 2 可以看出, 各分析物标准曲线相关系数均大于 0.99; 峰面积的相对标准偏差 (RSDs, $n=6$) 小于 9.75%; 迁移时间的 RSD($n=6$) 小于 0.67%。

用已知最低浓度的样品与空白试验对照, 记被测药物的信号强度 S 与噪音强度 N, 以能达到 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 时的样品最低浓度为检出限和定量限。

表 3 3种药物在不同浓度下的回收率

Table 3 The recoveries of 3 drugs in different concentrations

组分 Components	加标水平/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Spiked level	回收率/% Recoveries	RSD (%, n=6)
达氟沙星 Danofloxacin	15	81.65	9.14
	60	84.00	3.88
	100	71.00	2.25
恩诺沙星 Enrofloxacin	15	76.35	9.29
	60	72.00	8.51
	100	79.92	3.93
培氟沙星 Pefloxacin	15	81.35	5.75
	60	84.58	9.49
	100	72.16	5.04

本试验达氟沙星的最低检测限为 $0.45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 恩诺沙星的最低检测限为 $0.39 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 培氟沙星的最低检测限为 $0.30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.2 回收率测定 为了验证方法的准确性进行了加标回收试验, 分别向空白牛奶样品中添加浓度水平为 15、60 和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 3 种药品的混合标样各 1 mL 进行测定, 每个水平平行 6 份, 计算平均加标回收率及相对标准偏差见表 3。样品加标回收率及 RSD 满足痕量分析的要求。

2.4 样品的测定

最终检测结果为 15 组样品含有达氟沙星残留, 且样品中达氟沙星残留浓度在为 $35.94\text{-}52.38 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间。

试验中所确定含有农残的 15 组牛奶样品中的达氟沙星残留量已远远超过食品中所允许氟喹诺酮类药物残留所规定的 $30\sim 1000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的最大限量。由此可发现一些牧场对奶牛用药存在用量偏大、不合理用药等特点, 乳制品的质量安全问题依然不容乐观。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.27-2003. 食品卫生微生物学检验: 鲜乳中抗生素残留量检验[S]. 北京: 中国标准出版社.
- [2] 梁明振, 杨炳壮, 苏宏伟, 等. 水牛奶营养价值评价[J]. 广西畜牧兽医, 2007, 23(3): 124-126.
- [3] 沈建忠, 谢联金. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
- [4] Tong C L, Zhuo X J, Liu W P, et al. Synchronous fluorescence measurement of enrofloxacin in the pharmaceutical formulation and its residue in milks based on the yttrium (III)-perturbed luminescence[J]. Talanta, 2010, 82(5): 1858-1863.
- [5] Molbak K, Gerner-smidt P, Wegemer H C. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis[J]. Emerging Infectious Disease, 2002, 8(5): 514-515.
- [6] 章银良, 伍季, 鲍彤华. 牛奶中抗生素残留检测方法的研究现状[J]. 郑州轻工业学院学报, 2006, 21(4): 21-25.
- [7] 王贵芳. 牛奶中抗生素残留的预防措施及最新检测手段[J]. 中国食品添加剂, 2008: 285-288.
- [8] 中华人民共和国农业部. 无公害食品[M]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 40-45.
- [9] 饶勇, 曾振灵, 杨桂香, 等. 液相色谱-质谱联用检测牛奶中氟喹诺酮类药物残留的确证方法[J]. 中国农业科学, 2007, 40(5): 1033-1041.
- [10] 姜金庆, 杨雪峰, 王自良, 等. 氟喹诺酮类药物多残留间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(11): 887-892.
- [11] Pallares R, Fenoll A, Linares J. The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2003, 22: 15-24.
- [12] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 257-258.
- [13] 刘波静. 4种氟喹诺酮类药物在肉鸡组织中残留的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(1): 112-115.
- [14] Randall L P, Eaves D J, Cooles S W, et al. Fluoroquinolone treatment of experimental *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infections in chickens selects for both *gyrA* mutations and changes in efflux pump gene expression CJ3[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56(2): 1297-1306.